

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2004-003965**

(43)Date of publication of application : **08.01.2004**

(51)Int.Cl.

G01N 33/15

(21)Application number : **2003-027275**

(71)Applicant : **EFFECTOR CELL INSTITUTE INC**

(22)Date of filing : **04.02.2003**

(72)Inventor : **KANEGASAKI SHIRO**

(30)Priority

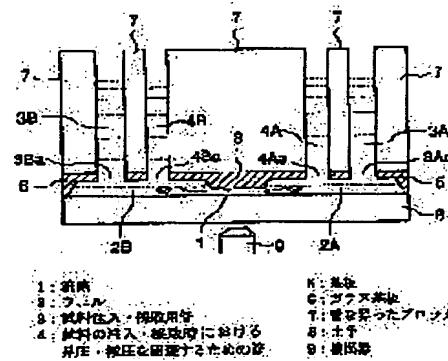
Priority number : **2002105415** Priority date : **08.04.2002** Priority country : **JP**

(54) METHOD FOR TESTING TOXICITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for testing toxic substances, through the utilizing of the chemotaxis or the random movements of cells, which is capable of accurately and easily detecting the movements of the cells based on their own forces through the use of a small amount of a cell sample, in detecting the toxicity of the substances is detected.

SOLUTION: In the toxicity testing method, in a cell chemotaxis-detecting device, two wells A and B, capable of housing a liquid sample in a stationary state, communicate with each other via a channel having resistance to the movements of cells, and each well is provided with a tube for injecting/drawing the sample out by suction; a cell suspension solution and a specimen containing a liquid or a cell suspension solution, previously treated with a specimen, is inserted in one well A of the cell chemotaxis-detecting device; a sample containing a cell chemotaxis factor or no sample is inserted in the other well B; and then the presence or the absence of the movement of the cells in the direction of the well B or of their random movements is detected.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] **16.11.2005**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

METHOD FOR TESTING TOXICITY

Publication number: JP2004003965
Publication date: 2004-01-08
Inventor: KANEKASAKI SHIRO
Applicant: EFFECTOR CELL INST INC
Classification:
- **international:** G01N33/15; G01N33/15; (IPC1-7): G01N33/15
- **european:**
Application number: JP20030027275 20030204
Priority number(s): JP20030027275 20030204; JP20020105415 20020408

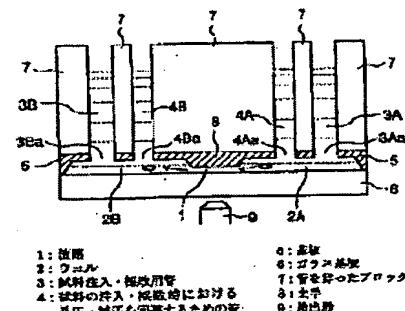
Report a data error here

Abstract of JP2004003965

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for testing toxic substances, through the utilizing of the chemotaxis or the random movements of cells, which is capable of accurately and easily detecting the movements of the cells based on their own forces through the use of a small amount of a cell sample, in detecting the toxicity of the substances is detected.

SOLUTION: In the toxicity testing method, in a cell chemotaxis-detecting device, two wells A and B, capable of housing a liquid sample in a stationary state, communicate with each other via a channel having resistance to the movements of cells, and each well is provided with a tube for injecting/drawing the sample out by suction; a cell suspension solution and a specimen containing a liquid or a cell suspension solution, previously treated with a specimen, is inserted in one well A of the cell chemotaxis-detecting device; and then a sample containing a cell chemotaxis factor or no sample is inserted in the other well B; and then the presence or the absence of the movement of the cells in the direction of the well B or of their random movements is detected.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-3965
(P2004-3965A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.⁷
G01N 33/15F 1
G01N 33/15

テーマコード(参考)

Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L. (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2003-27275 (P2003-27275)
 (22) 出願日 平成15年2月4日 (2003.2.4)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-105415 (P2002-105415)
 (32) 優先日 平成14年4月8日 (2002.4.8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 500201406
 株式会社 エフェクター細胞研究所
 東京都目黒区駒場4-6-2 メゾン駒場4
 O 1号
 (74) 代理人 100082739
 弁理士 成瀬 勝夫
 (74) 代理人 100083080
 弁理士 平田 克文
 (72) 発明者 金ヶ崎 士朗
 神奈川県川崎市多摩区舟形1丁目21-2
 -503

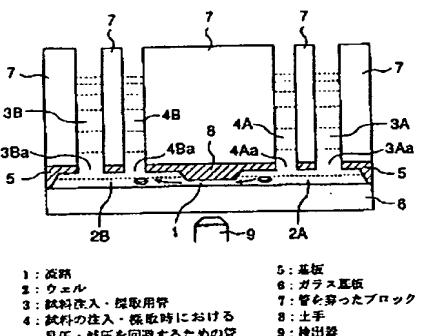
(54) 【発明の名称】毒性試験方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、細胞の走化性又はランダムムーブメントを利用する毒性物質の試験方法に関わり、物質の毒性を検出するに当たり、少量の細胞試料を用いて、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出しうる方法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出すための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、他方のウエルBには細胞走化性因子を含有する試料を入れるが又は入れることなく、細胞のウエルBの方向への移動又はランダムムーブメントの有無を検出することによる検体の毒性試験方法である。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、他方のウエルBには細胞走化性因子を含有する試料を入れるか又は入れることなく、細胞のウエルBの方向への移動又はランダムムーブメントの有無を検出することによる検体の毒性試験方法。

【請求項2】

液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、他方のウエルBに細胞走化性因子を含有する試料を入れ、次いで細胞の走化性有無を検出することによる検体の毒性試験方法。

【請求項3】

液体試料を静止した状態で収納できる3個のウエルA、B及びCが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して直列に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一端のウエルAに細胞懸濁液を入れ、他端のウエルCに細胞走化性因子を含有する試料を入れ、任意の段階において中央のウエルBに検体を入れ、次いで細胞の走化性有無を検出することによる検体の毒性試験方法。

10

20

【請求項4】

液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、更に任意の段階において血清を加え又は加えずに、流路におけるランダムムーブメントの有無を検出することによる検体の毒性試験方法。

【請求項5】

細胞走化性検出装置が、夫々のウエルにおいて試料を注入・吸出するための管と共に、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えていることを特徴とする請求項1乃至4記載の検体の毒性試験方法。

30

【請求項6】

細胞走化性検出装置が、夫々のウエルにおける試料を注入・吸出するための管の縦で、又は夫々のウエルにおける試料を注入・吸出するための管及び注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管の縦でが、それ等の上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする請求項1乃至4記載の検体の毒性試験方法。

【請求項7】

細胞走化性検出装置が、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、流路に土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び/又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成するべく設けられていることを特徴とする請求項1乃至4記載の検体の毒性試験方法。

40

【請求項8】

検体と細胞を接触させ、該検体により細胞走化性又はランダムムーブメントが消失するか否かにより該検体が該細胞に対する毒性を有するか否かを判定することを特徴とする検体の毒性試験方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

50

本発明は、物質の毒性試験方法に関する。より詳細には、細胞の生物学的動態、特に走化性又はランダムムーブメントを指標として物質の毒性有無を検出・判定する方法に関する

【0002】

【従来の技術】

生物に対して毒性を含む種々の重大な影響（以下、単に「毒性」という）を及ぼす物質には、人工的に合成された化学物質を始めとして生物由来の物質まで、様々な種類があり、これ等の物質の毒性試験が様々な分野で行われている。例えば、薬物や薬剤候補物質の毒性試験、食品・飲料を始めとする食用品の毒性試験、工場廃水の毒性試験、環境汚染のチェック、その他多数のケースが挙げられる。

10

【0003】

環境汚染を例に取れば、ダイオキシン、環境ホルモン、大気汚染物質等による汚染が社会問題になっており、更には微量であるが多数の化学物質による複合的な汚染が問題となる場合があり、人為的に生成された産物としての化学物質のみでなく、その副産物や、更にはそれ等が環境中で分解乃至変換された二次的産物も原因となり得る。化学物質として登録されているもので1000万種近くの物が知られており、しかも、それは年々増加している。かくして環境汚染の原因物質として、人を含む生物に影響を与える可能性のある物質は無数に存在することが考えられるが、その内、毒性に関する情報が得られているのは1割程度であると言われている。

20

【0004】

従来、環境汚染の原因物質を検出するためには、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、核磁気共鳴、質量分析等の技術に基づく物理的分析、或いは化学呈色反応を利用した化学的分析が主として行われてきたが、上記するように多数存在する環境汚染物質の総てを検出・同定・定量し、また毒性の評価を行うことは事実上不可能であり、極めて重大な影響を与える可能性のある物質であっても見過ごされる可能性があり、複数の化学物質の組合せが生物に重大な影響を与えていたことを見落とす可能性も否定できない。

【0005】

環境中の毒性物質を的確に検出できる試験系として、バイオアッセイによる毒性評価試験技術が、その簡便さ、高感度の故に注目されている。ここに、「バイオアッセイ」とは、生物を用いた化学物質の評価のことで、化学物質の毒性等に関する情報を生物学的な応答反応により評価することである。従来実用化されている生体細胞を用いるバイオアッセイ技術は、主に細胞数の変化や代謝活性、DNA合成、タンパク合成等を指標としたものであり、これ等は何れも個々の細胞の内部での生化学的反応に対する化学物質の影響を検出・測定し、或いは判定するものであるが、細胞を数日間にわたり培養する必要がある等、一般的に測定時間が長い等の問題がある。また、上記した従来のバイオアッセイ技術では、化学物質の生体免疫系に対する影響を評価するための細胞間の相互作用や外部環境に対する細胞応答性、細胞走化性反応等を評価することはできない。

30

【0006】

本発明は、後述するように、細胞の走化性又はランダムムーブメントを指標とする種々の物質の毒性試験方法であるが、細胞の走化性又はランダムムーブメントを検出する手段として充分な性能を備えたものは存在しない。例えば、細胞の走化性を 10^{-6} cm/s で検出する装置としてポイデンチェンバーが使用されてきた（非特許文献1参照）。これは、細胞が通過できる大きさの穴（直径 $3 \sim 8 \mu\text{m}$ ）があいているフィルターで上室と下室とに2分された構造を有し、上室に細胞浮遊液を、下室に走化性因子を含む検体溶液を入れ、走化性因子に向かって移動する細胞がフィルターを通過し又はフィルターの裏面に現れた数を観察する装置である。今日最も普通に使用されている装置であるが、細胞浮遊液の量として、 $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の濃度の浮遊液を $1/4 \text{ mL} \sim 1/20 \text{ mL}$ 要する。これは、細胞数にして、少なくとも 5×10^4 個を必要とすることを意味する。多量に得られる細胞を対象とする場合はさしたる問題はないが、例えば、好酸球は抹消血白血球に占める割合が $1 \sim 5\%$ 程度、好塩基球は同じく 1% 以下、単球は同じく $1 \sim 5\%$ 程度である。

40

50

2%程度であり、この様な少量のみ存在する細胞を対象とする場合は、必要量を手に入れるために多くの労力を要する。また、マウスのような小動物を用いる場合、採血可能な量は限られており、一頭あたりせいせい1.0ml程度であり、その性質を調べるには使用量が少ないことが望まれる。また、ホイデンチャンバーにおいては、移動する過程にある細胞の状態の観察や数の計数をすることができないこと、細胞のランダムムーブメントによるフィルターの通過現象と細胞の走化性によるフィルターの通過現象との区別がつきにくく、往々にして判定を誤る可能性を否定できない。

【0007】

細胞の走化性を数個のレベルで観察できる定性用スライドグラスが市販されている（ニューロープ社製、商品名ジグモンドチャンバー／非特許文献2参照）。これは、横幅5×75mm、厚さ2mmの顕微鏡ガラススライド上に、1mm幅のプリッジ（流路）を挟んで横方向の長さ25mm、幅4mm、深さ1mmの溝（ウエル）が2個設けられている。即ち、二つのウエルが流路を挟んで連通した形を有している。一方のウエルに細胞浮遊液を入れ、他方のウエルに走化性因子を含有する検体溶液を入れ、カバーグラスを被せて、一方のウエルから流路を越えて他方のウエルへ移動する細胞を顕微鏡で観察する。然し、プリッジが細胞の径又は変形能に合わせた空間を形成することは想定されていない。また、流路に細胞が通過する溝は設けられていない。更に、一個のウエルの容積が100μlであり、少なくとも1/10mlの細胞浮遊液を要する。

【0008】

また、同様な構造のものとして、スライドグラス上に、同心円状に二つの溝（ウエル）を設け、その間をプリッジ（流路）で隔てたケモタキシスチャンバーが市販されている（ウェーバーサイエンティフィック社製、商品名ダンケモタキシスチャンバー）。これは、内側のウエルに細胞浮遊液を、外側のウエルに検体を夫々入れ、カバーグラスを被せて、流路を通過する細胞を顕微鏡で観察するものである。流路はカバーグラスより20μm低く設定されており、細胞はその隙間を通過する構造である。ここで、流路の平面とカバーグラスとの間で形成される距離は細胞の径又は変形能とは無関係に設定されており、また、流路には細胞が通過する溝が設けられていない。そして、これ等、上述のスライドグラスタイプのものは、何れもウエル内における細胞の移動を精密に制御することができます、また、細胞をウエル内に注入する際の不測の移動を排除することができないため、判定に誤差を生じる可能性が高い。

20

30

【0009】

【非特許文献1】

Boyden, S., J. EXP. MED., 115:453 (1962)

【非特許文献2】

Edmond, S. H., J. Cell. Biol., 75:606-616 (1977)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、細胞の走化性又はランダムムーブメントを指標として物質の毒性試験を行う方法に関わり、少量の細胞を用いて、細胞や試料注入時ににおける細胞の不測の移動等の測定がく乱要因を排除して正確に、且つ、高感度で毒性評価を行う方法を提供することを目的とする。

40

【0011】

即ち、本発明は、(1)液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、他方のウエルBには細胞走化性因子を含有する試料を入れるが又は入れることなく、細胞のウエルBの方向への移動又はランダムムーブメントの有無を検出することによる検体の毒性試験方法である。

50

【0012】

また、本発明は、(2) 液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、他方のウエルBに細胞走化性因子を含有する試料を入れ、次いで細胞の走化性有無を検出することによる検体の毒性試験方法であり、或いは、(3) 液体試料を静止した状態で収納できる3個のウエルA、B及びCが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して直列に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一端のウエルAに細胞懸濁液を入れ、他端のウエルCに細胞走化性因子を含有する試料を入れ、任意の段階において中央のウエルBに検体を入れ、次いで細胞の走化性有無を検出することによる検体の毒性試験方法である。

10

【0013】

また、本発明は、(4) 液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルA及びBが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置の一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、更に任意の段階において血清を加え又は加えずに、流路における細胞のランダムーブメントの有無を検出することによる検体の毒性試験方法である。

20

【0014】

ここで、(5) 本発明で使用される細胞走化性検出装置は、夫々のウエルにおいて試料を注入・吸出するための管と共に、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えていることが好ましい。更に、(6) 該細胞走化性検出装置は、夫々のウエルにおける試料を注入・吸出するための管の縦て、又は夫々のウエルにおける試料を注入・吸出するための管及び注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管の縦てが、それ等の上端部において液体を収納できる空間を共有していることが好ましい。また、(7) 該細胞走化性検出装置は、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、流路に土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成するべく設けられていることが好ましい。

30

【0015】

更に本発明は、(8) 検体と細胞を接触させ、該検体により細胞走化性又はランダムーブメントが消失するか否かにより該検体が該細胞に対する毒性を有するか否かを判定することを特徴とする検体の毒性試験方法に関わる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、第1義的にはケモカインによる細胞の走化性に着目した物質の毒性評価を行う方法に関わり、第2義的には細胞のランダムーブメントに着目した物質の毒性評価を行う方法に関わる。

40

【0017】

ここで、本発明において毒性試験の指標とする「細胞走化性」とは、細胞が特定の化学物質を認識し、その濃度勾配に応じて移動する性質のことで、走化性因子とはその化学物質のことを云う。走化性は細胞の最も鋭敏な反応の一つであり、典型的な走化性因子であるケモカインの類には 10^{-9} モルという極めて微量な濃度でも反応する。これ等の物質は、一般的には、高濃度になると細胞を活性化することが知られている。しかし、細胞が他の物質により重大な影響を受けた場合は走化性因子の作用に対して反応を示さなくなる。本発明は、この現象を利用して物質の毒性試験を行うものであり、そのために細胞の自力による移動を正確に捉える装置を用いるものである。

50

【0018】

細胞が走化性を示す時は、細胞の一部が進行方向に伸展（糸状仮足、葉状仮足）し、接着斑を形成した後、そこへ細胞質が進行方向に移動するステップが必要である。ケモカインによる細胞走化性においても、細胞は運動方向側にアクチンフィラメントを再重合させ、平行に走ったアクチンフィラメントの束を含む糸状仮足や、網状に枝分かれしたアクチンフィラメントを含む葉状仮足といった形態が観察される。これまでの細胞走化性の研究から、アクチンフィラメントの再重合へのシグナルは、F R L又はDOCK2↑Rac↑I RSP53↑WAVE↑Arp2/3↑アクチン重合↑葉状仮足、または、Cdc42↑N-WAVE↑Arp2/3↑アクチン重合↑糸状仮足といったモデルが考えられている。このモデルがケモカインにおいても当てはまることを示唆する事実が幾つも見出され、報告されている（灰野 誠、松島網治、分子細胞治療 第2巻6号 567～576（2001））。従って、細胞に対する毒性物質はこれ等の経路の何れかを遮断するものと考えられ、その結果として、走化性が消失することになる。更に、細胞の走化性は、息、リュウマチ等のアレルギー性疾患、感染症や通風等の各種炎症性疾患のように、様々な疾病的成立と密接に関わっており、この機構に影響を及ぼす物質は、所謂、毒性物質として、ヒトを始めとする生物系に重大な影響を及ぼすものと考えられる。

10

【0019】

細胞に対して重大な影響を及ぼす物質としては、解糖系に対して影響を及ぼす物質、アクチン／ミヨシン相互作用に影響を及ぼす物質、細胞接着に影響を及ぼす物質等、種々多様な機作を通じて影響を及ぼす物質が存在し、無機化合物やイオン、有機化合物等、多岐にわたる。本発明は、これら種々の物質について、これ等が細胞の生命現象の一つである走化性を停止させるか否かを指標として、毒性試験を行う方法に関する。

20

【0020】

試験に用いる細胞は、目的に応じて任意に選ぶことができるが、血液細胞、例えば、好中球、好酸球、リンパ球等の白血球、マクロファージ等から選ぶことができる。中でも、好中球は比較的入手し易く、取り扱いも容易であり、好ましい例である。細胞は、試験の目的に応じ、ヒト、ヒト以外の動物、例えばマウス、ラット、イヌ等から適宜選択して使用することができる。

【0021】

細胞に対する走化性因子は、ケモカインファミリーとして細胞毎に明らかにされており、例えば、好中球に対しては、IL-8、N-ホルミル-Met-Leu-Phe等が知られている。好酸球に対しては、Val-Gly-Ser-GluやAla-Gly-Ser-Glu、ガレクチン9（ガレクチン/J. Biol. Chem. Vol. 273 (27), 16976-16984 (1998)）、エオタキシン（J. Biol. Chem. Vol. 271 (18), 7725-7730 (1996)）等のペプチド性因子が知られている。マクロファージ・単球に対してはMCP-1が知られている。かくして、細胞の種類と走化性因子の組合せを選ぶことにより、物質が細胞に及ぼす影響の違いを知ることができる。

30

【0022】

細胞は走化性因子に対する走化性以外に、走化性因子が存在しない状態においても無方向に移動する現象（ランダムムーブメント又はランダムマイグレーションと呼ばれている）を示すことが知られている。かかるランダムムーブメントも細胞の生命現象の一つであり、その動きの有無を指標として、物質の細胞への影響の有無を判定することができる。本発明によれば、精密な細胞の動きを追跡し、検出することができるため、ランダムムーブメントを指標とする毒性試験方法も提供される。ランダムムーブメントを指標とすれば、高価な走化性因子を使用しないで済むというメリットがある。また、本発明者が得た知見によれば、ランダムムーブメントは血清の存在により増進する。例えば、好中球懸濁液を37℃で30分間維持するとランダムムーブメントは消失するが、これに終濃度にして約10%の血清を添加するとランダムムーブメントが復活することが観察された。

40

この現象を利用して、後述するようにランダムムーブメントの消失をより正確に確認する

50

ことができる。

【0023】

本発明で細胞の走化性又はランダムムーブメントの有無を判定乃至検出するための装置は、液体試料を静止した状態で収納できる2個のウエルが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して相互に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置であり、その一つのウエルAに細胞懸濁液及び検体含有液を入れ、又は予め検体で処理した細胞の懸濁液を入れ、細胞のウエルBの方向への移動又は流路におけるランダムムーブメントの有無を検出することにより検体の毒性試験を行うことができる。

この場合において、細胞を血清で処理するとランダムムーブメントが増進される状況を設定することができ、その状況においてなおランダムムーブメントが抑制されるか否かを判定することにより、より正確に検体（毒性物質）の細胞に対する影響を調べることができます。細胞を処理する際の血清の濃度は、終濃度で10%程度でよいが、これに限らず、適宜の濃度を選択できる。

【0024】

本発明において使用することができる装置の他の好ましい態様としては、液体試料を静止した状態で収納できる3個のウエルA、B及びCが細胞の移動に対して抵抗性を有する流路を介して直列に連通しており、且つ、夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管を備えている細胞走化性検出装置であり、その一端のウエルAに細胞懸濁液を入れ、他端のウエルCに細胞走化性因子を含有する試料を入れ、任意の段階において中央のウエルBに検体を入れ、次いで細胞の走化性有無を検出することにより、検体の毒性試験を行うことができる。

【0025】

更に、上述の細胞検出装置は、夫々のウエルにおいて試料を注入・吸出するための管と共に、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えていることが好ましく、また、これ等、試料を注入・吸出するための管の総て、又は、試料を注入・吸出するための管及び注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管の総てが、それ等の上端部において液体を収納できる空間を共有していることが好ましい。かかる構造を採用することにより、試料をウエル内に注入する際の液圧で試料が他方のウエルに移動し、判定を誤らせるのを防止することができる。

【0026】

本発明において用いられる細胞走化性検出装置の好ましい態様は、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、流路に土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成するべく設けられていることである。

【0027】

ウエルが流路を介して互いに連通している一組の構造体（以下、ウエルユニットと呼ぶ）の複数を集積させることにより、多数の検体を同時に処理することが可能となる。

【0028】

複数のウエルユニットを集積させ、これ等のウエルに試料・検体を供給するための自動ピペットの操作をコンピュータープログラムで制御することにより、試料・検体の供給操作を自動化することができる。

【0029】

以下において、本発明をより具体的に説明するが、これ等は代表例を述べているものであり、本発明を限定するものではない。

【0030】

図1は、本発明で用いられる装置の一例を示すもので、ウエル2Aに、管3Aを通して細胞懸濁液が注入される。ウエル2Bには走化性因子を含む溶液が管3Bを通して注入され、細胞が正常な状態である場合は、細胞がウエル2Aからウエル2Bに向かって移動しよ

10

20

30

40

50

うとして、流路 1 を通過する。図 1 の場合、流路 1 は、基板 5 に設けられた土手 8 と透明なガラス基板 6 との間で、細胞の大きさに相当する隙間が形成されているが、1 個の細胞が通過できる細い溝を複数本構成する障壁が形成されても良い（例えば、図 17 参照）。流路 1 を通過する細胞の状況は、ガラス基板 6 を通して、例えば顕微鏡 9 で観察される。図 2 は基板 5 の下面図である。なお、図 1 及び図 2 で例示する装置は、各ウエルにおいて管 3 A と 4 A、3 B と 4 B が相互に連通した構造であり、連通管を通して圧力を分散させる構造である。この装置において、ウエル 2 A に細胞懸濁液と検体含有溶液を入れ、ウエル 2 B に走化性因子含有溶液を入れ、細胞が流路 1 を通過するかどうかを検出器 9 で観察する。細胞の移動が検出されなければ、細胞は走化性を失っており、検体は細胞に対して重大な影響を及ぼす物質であると判断される。以下に述べる装置も同様に使用される

10

【0081】

図 3 は、本発明で使用される装置の他の例を示すもので、基板 5、プロック 7 及びガラス基板 6 から構成されるユニットを示している。図 3 において、10 で示す空間が、各ウエルに設けられた管 3 A、3 B の上端部 3 A b、3 B b により共有される空間であり、装置全体は、細胞走化性に影響を与えない液体、例えば緩衝液等で満たされている。その液体の量は該空間 10 の少なくとも一部を満たす量である。この液体により、装置全体が同一の圧力下に置かれ、且つ、液体の抵抗により、試料の注入圧及びウエルの水平が崩れた場合による試料の急激な移動が抑制される。かくして、走化性因子の濃度勾配が水平方向に形成されると共に長時間にわたり維持される。

20

【0082】

図 4 は、更に他の例を示すもので、各ウエルが試料注入のための管 3 A、3 B 以外に、それと連通する関係にある管 4 A、4 B を有し、それ等総ての管の上端部 3 A b、4 A b、3 B b、4 B b が空間 10 を共有するユニットの構造を示す。

【0083】

図 5 は、各ウエルにピペットで試料を注入する作業を容易にするために、夫々の注入管の上端部の周りを、注入管の径よりも大きくローと状に掘り窪めた例である。図 5 (1) は装置の断面図であり、(2) は上面図である。

【0084】

上記構造の変形として、試料、例えば、細胞懸濁液を収納するためのウエルに設けられた管の上端部が、流路を介して相対するウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されている構造を有しても良い。例えば、図 6 において、管が設けられているプロック 7 は、ウエル 2 B に設けられた管 3 B の上端部 3 B b の周辺で掘り下げられており、ウエル 2 A の管 3 A の上端部 3 A b が管 3 B の上端部 3 B b より高く形成されている。装置全体を満たす液体は、当初は、その液面が、管 3 A の上端部 3 A b より上に来るよう、図中、矢印 I で示される位置に来るよう液量を調節する。その状態で、管 3 A を通じて細胞懸濁液及び検体含有溶液をウエル 2 A に注入する。細胞は、装置全体の均一な圧力と液体の抵抗により、急激な移動が抑制され、管 3 A 内及びウエル 2 A 内に散在している。次に、空間 10 から液体を吸引除去して液面を矢印 II の位置、即ち、管 3 A の上端部 3 A b が露出する位置まで下げ、更に、適量の液体を吸引することにより、管 3 A 内及びウエル 2 A 内に散在していた細胞を、ウエル 2 A 内の流路の近傍に集めることができる。吸引する液量は、管 3 A 及びウエル 2 A の容積に基づき算出でき、通常は、該容積の 3 分の 1 乃至 10 分の 1 で目的が達せられる。なお、ウエル 2 B への走化性因子含有溶液の注入も、液面を再び矢印 I の位置に戻した状態で行うことにより、注入時の急激な圧力変化が緩和される。

30

【0085】

液面を再び矢印 I の位置にまで戻す場合に使用する液体として、予め装置内に存在する液体（緩衝液等の水溶液）より比重が軽い液体を用いると、各ウエルの管の上部が軽い液体により蓋がされた形になり、遮断効果により、試料の無用の拡散が防止される。かかる液体としては、試料に対して不活性であり、水に不溶で、比重が 1.0 未満であれば適宜選

40

50

況して使用できる。そのような液体の例として、ミネラルオイル（比重0.84／シグマ社製M3516）、流動パラフィン等が挙げられる。

【0036】

図7は、各ウエルが試料を注入するための管3A、3Bと共に、これと連通する関係にある管4A、4Bを備えている場合において、ウエル2Aの管の上端部3Ab、4Abがウエル2Bの管の上端部3Bb、4Bbより高く設定されている場合を示す。図8は、プロック7に斜面を形成させることによりウエル2Aの管の上端部を高く設定した場合を示す。これらは、一方の管の上端部を他方のそれより高く設定する場合の例示であり、同一の目的を達するために、他にも種々の変形がありうる。

【0037】

本発明で使用される装置のウエルユニットは目的に応じて種々のウエルの連通様式を採用することができる。即ち、流路を介したウエルの連通様式として、図2に例示する如き2連式の他に、必要に応じて更に結合させ、連通させることもでき、例えば、図9に例示する3連式が考えられる。図9において、例えば、ウエル2Aに細胞を、ウエル2Cに走化性因子を入れ、ウエル2Bに検体含有溶液を入れることにより、検体溶液が細胞に影響を与えるか否かを調べることができる。

【0038】

図10に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもできる。更には、図9のタイプの変形として、図14の如く、同心円状にすることもできる。図14は、3連式を同心円状にした例であるが、2連式でもこのタイプを採用することができる。図10のウエルユニットの場合、図11に例示するように、貫通孔3Aα上に管3Aが設けられており、貫通孔3B₁～4α上には管3B₁～4が、貫通孔4B₁～4α上には管4B₁～4が夫々設けられる。ウエル2Aに管3Aを通して細胞浮遊液と検体溶液を入れ、ウエル2B₁～4に種々の走化性因子含有溶液を入れることにより、複数の走化性因子に対する検体の関係を同時に調べることができる。検体が、所謂、毒性物質ではなく、走化性因子阻害剤であった場合にも走化性が見られないために誤って毒性物質と判定される恐れがあるが、複数の走化性因子について検体の作用を調べることにより判定の誤りを回避することができる。図10に例示するウエルユニットはかかる目的に使用する場合において便利である。

【0039】

なお、ウエル内における細胞の位置を調整し易くするために、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸濁液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けてもよい（図12）。図12は、流路1を介してウエル2A、2Bが連通しており、夫々のウエルに、流路1に直交して壁24A及び24Bが設けられている場合を示す。壁24と流路1との間隔は任意に設定できる。図13は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、（1）はウエルの幅の一部に流路が設けられている場合を、（2）は流路が中央で二分され、流路を挟んで一個のウエル（2A）に対し二個のウエル（2B、2C）が設けられていると共にウエル2A側にのみ壁24が設けられている場合を、（3）は流路において障壁の列がテラス11を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示として挙げたもので、これ等に限られないことは云うまでもない。また、必要に応じ、流路に直交して設けた壁と土手の間をテラスにしてもよい。

【0040】

ウエルは、細胞懸濁液、走化性因子含有液、検体溶液を静止した状態で収容するための容器であり、その容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納できればよい。例えば、深さ0.05～0.1mm程度、幅1.2mm程度、長さ2.5mm程度あれば充分である。

【0041】

流路1は、両端のウエル2Aとウエル2Bを隔てる土手8（基板5上の突出部）及びガラス基板6により構成される（図15）。土手8は、流路1の両端にあるウエル2A、2B

10

20

30

40

50

を隔てるもので、土手 8 のサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ 0.003~0.1 mm 程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして 0.01~0.5 mm 程度、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さとして 1.2 mm 程度あればよい。

【0042】

好みしい態様としては、土手 8 の上に、図 17~図 19 に例示されるような複数の障壁 1~2 が設けられ、細胞が通過する溝 1~3 が形成される。溝の幅は細胞の径又は細胞の変形能に合わせて設定される。ここに、細胞の変形能とは、細胞が弾力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状(球状)において有する径よりも狭い間隔の溝を通り抜けることを言う。かかる溝を設けることにより、溝を通過する細胞を個々のレベルで観察することが可能となる。土手の上部に溝を構成する障壁を設けない場合は、土手の上面がガラス基板との間で細胞の径又は細胞の変形能に合わせた深さ乃至隙間であるテラスを形成する。この場合の幅/深さは、細胞の種類に合わせて、通常 3~50 μm から選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T 細胞、B 細胞等の場合は 3~10 μm、例えば 4、5、8 又は 10 μm から選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は 8~20 μm の幅が選ばれる。

10

【0043】

土手の上面に、障壁を挟んで、平面であるテラス 11 (例えば図 17 参照) を設けると細胞の通過が観察しやすくなる。テラス 11 を設ける場合、その相対するウエルに向かう方向の長さは約 0.01 mm 乃至約 0.5 mm から適宜選ばれる。なお、障壁を挟んで、一方のテラス 11-1 を他方 11-2 より長く設定することもできる(図 26 参照)。

20

【0044】

なお、図 16 に例示するように、テラス 11 を多段式に形成することにより、ウエル内で細胞の位置を調整するために、他方のウエル側から吸引するとき、細胞が土手 8 の近傍に集まり易くなる。例えば、試料が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス 11-2 及び 11-3 のガラス基板 6 からの距離(図 16 においては障壁 12 の高さ)を 3 μm、テラス 11-1 及び 11-4 のガラス基板 6 からの距離を 4.5 μm とし、ウエル 2 A に細胞を入れ、ウエル 2 B 側から吸引すると、これらの細胞はテラス 11-1 で一度止まつた後、テラス 11-2 とガラス基板 6 との間に集まり易くなる。各テラス 11-1~4 のガラス基板 6 からの距離は、取扱う試料に応じて適宜設定することができ、概ね 3 乃至 5 μm の範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス(11-3)の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス(テラス 11-2)より約 1.5 乃至 5 倍長くすると、溝を通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行うことができる。なお、図 16 は障壁 12 が設けられている場合を示しているが、テラス 11-2 及び 11-3 のガラス基板 6 からの距離が細胞の径又は変形能に相当する場合は、障壁は必ずしも必要ではない。

30

【0045】

土手の上面に障壁 12(図 17、図 19 他参照)を設ける場合、障壁 12 により構成される溝 1~3 の断面は、V 字型断面、凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができます。溝 1~3 の数は、流路の幅に対する障壁の幅と溝の幅で決定される。例えば、流路の幅 1 mm、障壁の幅 10 μm、溝の幅 5 μm の場合、溝の数は最大で 66 本となる。検出・観察に適した溝 5 の数は、1 乃至約 100 本、好みしくは好みしくは約 10 乃至約 70 本である。

40

【0046】

障壁 12 の長さは、約 5~約 400 μm から選ばれ、例えば、5、15、20、30、40、60、100、200、300 又は 400 μm のものが用いられる。障壁 12 自体の幅は適宜選ぶことができる。また、後述する図 22 の場合は、縦横の長さがほぼ等しい方が効果的である。

【0047】

50

流路 1 を形成する溝 1 3 は、図 1 9 に例示するごとく、相対するウエルに向かう方向に直交する 1 乃至複数本の溝 1 4 で互いに連通していくてもよい。かくすることにより、一方のウエルに入れた物質が他方のウエルに向かって拡散するのを均一化させ、或いは、細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、溝 1 3 の幅を、相対するウエルに向かう方向でこれに直交する溝 1 4 を横切る度に段階的に変化させてもよい(図 2 0、図 2 1 参照)。

【0048】

或いは、流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るごとに相互の位置関係を変えてもよい(図 2 2 参照)。図 2 2 では、2 分の 1 ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。この構造は、細胞の走化性を指標として毒性試験を行う際に支障となる細胞のランダムムーブメントの影響を少なくするのに適している。即ち、細胞がランダムムーブメントにより溝 1 3 a を通過することがあっても、溝 1 3 a を遮る形で存在する障壁 1 2 にぶつかって元のウエルの方向に戻ることが期待される。細胞のランダムムーブメントによる溝の通過を防ぐ構造として、これ以外にも、例えば図 3 4 (1) ~ (3) に示す構造が考えられる。即ち、図 3 4 (1) 及び (2) は、細胞の進行方向(矢印)に溝 1 3 を遮る形で細胞の進行の折り返しをさせ障壁 2 5 を設けた例を示す。細胞は細胞膜で障壁に接して移動するので、折り返し障壁 2 5 で進行方向を反転し、再び障壁 1 2 の壁面に沿って元の方向に戻ることになる。図 3 4 (3) は、障壁 1 2 を円形にした例を示し、ランダムムーブメントの細胞が障壁の壁面に沿って戻ることになる。なお、走化性に基づく移動においては、矢印の方向に自力で移動するので、元に戻ることはない。

10

【0049】

更には、障壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっていてもよい(図 2 3 参照)。また、土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで障壁の列を 2 箇所に形成することもでき(図 1 3 (3)、図 2 4、図 2 5 参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図 2 4、図 2 5 において、(1) は上面図、(2) は断面図である。

20

【0050】

障壁 1 2 の高さ(溝の深さ)は、細胞の移動を観察する際の顕微鏡や CCD カメラ等の対物レンズの焦点深度内に収まる深さであると便利であり、例えば、10 ~ 40 倍の対物レンズの焦点深度に合わせると 3 ~ 4.5 μm 程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

30

【0051】

流路を通過する細胞の状態を検出するに当たり、検出器 9 が一定時間経過毎に所定の流路上に戻り、繰返し検出を行う場合がある。例えば、後述するように、複数のウエルユニットを集積させた装置において、各ウエルユニットの流路を通過する細胞の状態を検出するため、検出器 9 をスキャンさせ、経時的に検出を行う場合である。このような場合、所定の流路においては検出画面の範囲が毎回同じになるよう、画面の位置決めを容易にするために、流路上の何れかの位置に印 1 5 を設けると便利である。印 1 5 は位置決めを容易にするために役立てば、如何なる形状でも良い。また、印 1 5 を設ける箇所は、土手 8 の上部、例えば後述のテラス 1 1 の何れかの箇所、或いは、何れかの障壁 1 2 の上部であっても良い。また、設ける印 1 5 の数は、1 個に限らず、複数個であっても良い(図 2 5 (1)、図 2 6、図 2 7 (2)、(3)、(4) 参照)。

40

【0052】

走化性因子を用いる場合は、走化性因子を入れる前に、他方のウエルにおいて細胞が同じ条件で、細胞の進行方向に向かってスタートラインに並ぶようになると、細胞のランダムムーブメントによる混乱を抑えるために重要である。そのための構造の一として、流路に細胞の移動を制限するための障害物を設けることが提案される。ここに云う障害物とは、細胞の移動を完全には遮断することなく、その移動を制限するもので、例えば、一

50

連の突起の並び、一連の三角柱や四角柱の並びを挙げることができるが、この目的を達成し得るならば如何なる形状でも採用し得る。障害物が設けられる位置は、土手の上部であることが好ましいが、目的を達成するのであれば、土手の上部に限られない。土手の上面に障壁が設けられておらず、全面がテラスである場合はその一端付近に設けられる（図27（1）の16）。土手の上面に障壁とテラスが設けられている場合は、障壁の列に並行して、テラスのウエル側に設けられる（図27（2）～（4）の16）。なお、図27において、（1）、（2）及び（4）は障害物として突起の並びが採用された場合の例示であり、（3）は三角柱の並びが採用された場合の例示である。障害物16の高さは、細胞の径又は変形能に合わせた長さと同等かそれの2分の1乃至4分の1あればよい。障害物16の間隔は、通常は、細胞の径又は変形能に合わせた長さと同等に設定されるが、高さが低く設定されている場合は、それより短く設定されてもよい。

10

【0053】

流路を介して連通した複数のウエルよりなるウエルユニットの複数個を1枚の基板上に配置乃至集積して多数検体を同時に処理する装置とすることができる。同じタイプのユニットを並列に配置し、又は、異種のユニットを配列することが可能である。以下に各図に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを探ることができます。図28は、図2に示すタイプの、2つのウエルが流路を介して連通してなるウエルユニットが、1辺が16mmの正方形である一枚の基板5上に12個設けられた例を示す。この例では、1つのウエルユニットの大きさは長辺が5.7mm、短辺が1.2mmであり、各ウエルユニットは0.8mmの間隔で配置されている。図29は、図12に示すタイプのウエルユニットが12個集積配置された場合を示す。

20

【0054】

図30は、図28に示される多数ユニットの集積を更に集積させた場合の一例を示す。即ち、図30においてA₁～4、B₁～4、C₁～4で表される四辺形の夫々が図28で示される集積である。ここで、A行、B行及びC行は互いに異なったタイプのユニットの集積であってもよい。

30

【0055】

図31は、2連式の独立したユニットが円形に集積されている例を示す。図31の一点破線における断面を図32に示す。大きさの一例を示せば、ウエル2A及び2Bは半径方向の幅が1.5mm、流路1の半径方向の幅は0.5mmであり、流路1には10μm幅の溝18が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は5.0mmとなる。

【0056】

これら、多数のユニットを集積させる場合において、ロック7やガラス基板6は、ユニット全体をカバーするように1個又は1枚とすることができる（図33参照）。

40

【0057】

図33は、多数ユニットを集積させた細胞走化性検出及び細胞分離装置を組立てた場合の一例を示す。カバーキャップ17と中間支持体21の間に多数ユニットを集積させた基板5、パッキング5'とそれをカバーする1個のロック7をおき、中間支持体21と底支持体22の間に1枚のガラス基板6をおき、ネジで締め付ける。ロック7と基板5との位置関係は中間支持体21で規定され、中間支持体21に設けられたガイドピン20とロック7の底面に設けられたガイドピン受孔19によって固定される。なお、基板5とロック7とは直接圧着させても良い。

【0058】

なお、図33において、集積ユニットの代わりに、1つのウエルユニット、即ち、1対のウエルと流路を設けた基板5を用い、全体を組み立てたユニットを、一定の間隔で複数個配置することも可能である。この場合、ユニット毎に逐次交換することができます。

【0059】

本発明で使用される細胞走化性検出装置においては、細胞懸濁液、走化性因子含有溶液及

50

び検体溶液をウエルユニットに供給する際、或いは、液面を調節するために空間10において液体を吸引・排出する際、例えば、コンピュータープログラムで制御されるオートピペットを用いて自動制御することが可能である。この目的に使用できるオートピペットは既に知られており、容易に自動制御機構を備えた検出装置を組み立てることができる（例えば、特願2001-348713号参照）。

【0060】

本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出できる手段であればよく、必要に応じ検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するためには既に知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、顕微鏡、顕微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズにCCDカメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

10

【0061】

検出手段は、通常は、図1や図4に示すように、ウエルユニットの流路に設定されるが、多数のウエルユニットを集積させた自動装置においては、所定の位置に設置された検出部に各ウエルユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採ることもできる。検出は、直線上に並んでいる各ウエルユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。スキャンする検出器は1個でも良いし、複数個でもよい。かくすることにより、比較的少ない数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

20

【0062】

流路上を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行なうことができるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

【0063】

以上説明した装置を用いて検体に毒性物質が存在するか否かを試験する方法の一例を述べれば次の通りである。まず、細胞とその走化性因子の組合せを選択する。次いで、ウエルの一つに細胞懸濁液を注入し、検体溶液を注入する。或いは、細胞を検体溶液で処理した後ウエルに注入しても良い。その後、他方のウエルに走化性因子含有溶液を注入し、細胞の走化性有無を検出する。検体に毒性物質が含まれていれば、細胞は走化性を示さない。

【0064】

他の試験方法としては、ウエルの一方に細胞懸濁液を入れ、他方のウエルに走化性因子含有溶液を入れる。細胞の走化性を確認した後、細胞の入っているウエル又は走化性因子が入っているウエルと細胞が入っているウエルとの間にあるウエル（例えば図9のウエル2B）に検体溶液を注入する。細胞が走化性を示さなくなれば、その検体には毒性物質が存在することがわかる。本発明で用いる装置は、ウエルへの試料の注入が細胞の動きに影響を及ぼさない、或いは、影響を最小限に抑えることができるので、細胞の移動が走化性の故であるのか、液体の注入圧によるのかの判定に混乱する事がない。

30

【0065】

細胞のランダムムーブメントを指標とする場合は、ウエルの一方に細胞懸濁液を入れ、次いで検体を入れるか、或いは、予め検体で処理した細胞をウエルに入れ、流路に現れる細胞の有無を検出することにより、検体の細胞への影響、即ち、毒性の有無を判定することができる。ランダムムーブメントを増進させるために細胞懸濁液に血清を添加することにより、測定の精度を上げることができる。

40

【0066】

多数集積型の装置を用いれば、検体を入れない対照群と検体を入れた測定対象群とを同時に検出し、比較することができる。しかも、同時に多数の検体を処理することができる。

【0067】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、これ等はもとより例示であり、本発明を限定するものではない。

50

【0068】

【実施例1】

これまでに走化性が確認されている細胞と走化性因子の組合せのとして、ヒト好中球とIL-8の組合せを用いて、ヒト好中球の走化性に影響を与える化学物質を加えることによりその影響を観測し、毒性の評価が可能であることを確認した。

【0069】

1) 実験に用いた検出装置、細胞、および試薬

1-1) 検出装置

使用した検出装置は、断面が図4に示す構造を有し、管3A、B及び4A、Bの断面は円形であり、ウエルユニットは図2のタイプであるが、貫通孔は何れも円形であり、また、土手8に設けられた障壁は図25の構造を有する。テラスの相対するウエルに向かう方向の長さは260μm、横幅は1200μmであり、障壁の高さは5μmである。図2におけるウエル2Aに細胞懸濁液を入れ、ウエル2Bに走化性因子含有溶液を入れ、ウエル2A側の障壁の列（細胞のスタートライン）からウエル2Bの方向に180～260μmの領域の細胞をカウントした。該装置は予め緩衝液RPMI 1640（SIGMA R7388）で空間部（図4の10）まで満たされている。

10

【0070】

1-2) 細胞

好中球は健常人よりヘパリンナトリウム（12.5IU/ml）真空採血管を用いて採血した。モノポリ分散溶液（大日本製薬）を用いて得られた粒球層を分取し混在した赤血球をosmotic shockにより除去しHBSS溶液（ギブコ）で洗浄した細胞を好中球とした。好中球を0.1%BSA RPMI 1640（SIGMA R7388）に浮遊させ 4×10^6 cells/mlに調整し、0.6μlずつ使用した。検出装置の1wellに2400個の細胞が注入されることになる。通常、上記検出装置を使用する時は100個から500個の細胞数で使用可能だが、このように過剰の好中球を注入することにより被験細胞数が増え、走化性因子を添加しなくとも画像検出部分に移動する、いわゆるrandom migrationの数も相対的に増えたため、通常数個程度のrandom migration数が過剰の細胞を注入すると数十個になり、走化性因子を加えなくても細胞は画像検出部分に遊走するのを観察することが出来、薬剤が細胞に与える影響をより生体内に近い状態での細胞の動きを観察することが可能である。

20

【0071】

1-3) 走化性因子

IL-8（コスモバイオ社製）は0.1%BSA PBSで溶解した後、RPMI 1640で希釈して 10^{-7} Mとし、1回当たり1μlずつ添加した。

30

【0072】

1-4) 毒性物質

日常、汎用されている薬品のうち、エタノール、アシ化ナトリウム、ホルムアルデヒドを選び、これら的好中球の運動能に与える影響を調べた。エタノールは手指の消毒、また、適スクリーニングに欠かせない細胞診の標本の固定液として用いられている。消毒剤として用いる場合70%で最も殺菌力が強く、細菌、結核菌、ウイルスを不活化する作用がある。細胞診の固定液として用いる場合は70～100%で、組織の脱水と蛋白質の沈澱作用を有する。アシ化ナトリウムは臨床検査検体や、種々の試薬における防腐剤として繊用されており、使用濃度は通常0.1%である。ホルムアルデヒドは病理学的標本の固定液として細胞のタンパク質を凝固させる作用を有する。ホルマリン原液（35.0～37.0%）が用いられている。固定液として使用する場合の濃度は10～20%である。近年、建築機材などに用いられていることからシャクハウス症候群の原因のひとつとも考えられている。

40

【0073】

2) 毒性試験

2-1) 細胞をウエルに注入した直後に毒性物質を作用させる方法

50

細胞懸濁液をウエル2Aに注入し、空間部（図4の10）から液体を吸引することにより細胞を所定の位置に並べ、その後にウエル2Bに 10^{-7} MのIL-8を1μl注入した。更に、種々の濃度に希釈したエタノール、アジ化ナトリウム、ホルマリンの各々1μlをウエル2Bに注入し、30分後における細胞の数をカウントした。結果を図35に示す。図において、(1)はエタノール、(2)はアジ化ナトリウム、(3)はホルマリンで処理した場合の結果を示す。各図から明らかな様に、添加した薬剤の濃度に従って、走化性を示す好中球の数が減少した。

【0074】

この方法は、主に即時型の毒性を検出するために利用できると考えられる。しかしながらこの方法では、薬剤が細胞に作用したために走化性が抑制されたのではなく、薬剤が走化性因子の活性そのものを失わせた可能性も否定できません、結果の評価には注意が必要である

10

【0075】

2-2) 細胞を薬剤とフレインキュベートした後に走化性因子を作用させる方法

2-2-1) エタノール曝露が遊走細胞数に与える影響

各濃度のエタノールによる細胞のフレインキュベートが細胞の走化性に与える影響を調べた。

【0076】

エタノールは純エタノール(99.5%)を滅菌蒸留水で10%、1%及び0.01%に希釈したものを使いた。これを好中球が含まれる培養液に終濃度が1%、0.01%及び0.001%となるように添加して、室温で30分間インキュベートした。なお30分後の好中球の生存率は96~98%であった。この細胞を洗浄した後に所定量をウエル2Aに注入し、次いでウエル2Bに 10^{-7} MのIL-8を1μl注入して細胞の走化性を観察した。IL-8注入後、画像検出部分を遊走した細胞数を5分おきにカウントした。下記に示すように、遊走細胞数はエタノールの濃度に依存して抑制されることが明確に示された。

20

細胞数

エタノール(%)	10分	15分	20分	
0.001	0	0	20	30
0.01	0	0	0	
0.1	0	0	0	
1	0	0	0	
暴露なし	0	0	55	

【0077】

同様にして、ホルマリン、アジ化ナトリウムの濃度を変えて好中球を処理して、IL-8との作用を調べた結果を下記に示す。細胞数はIL-8注入20分後における画像検出部分を遊走した数である。この場合も遊走細胞数が毒性物質により抑制されることが明確に示された。

40

1) ホルマリン (%)	細胞数
(対照) 0	100
0. 01	0
0. 5	0
1	0
10	0

2) アジ化ナトリウム (%)	細胞数
(対照) 0	100
0. 01	80
0. 1	50
0. 25	2
0. 5	0
1	0

【0078】

20

【実施例2】

実施例1で使用したと同一の装置、細胞及び毒性物質を用いて、細胞のランダムマープメントを指標とする毒性試験の可能性を検証した。即ち、各濃度の毒性物質と共にフレインキュベートした細胞懸濁液をウエル2Aに1μlずつ注入した場合(1)と、更にこれにヒト血清を終濃度が10%になる様に加えた場合(2)について、ウエル2A側の障壁の列(細胞のスタートライン)からウエル2Bの方向に0~260μmの領域の細胞をカウントした。結果を下記に示す。細胞数は、細胞注入20分後における画像検出部分を遊走した数である。細胞のランダムマープメントが毒性物質により抑制されることが対照との比較から明らかであり、ランダムマープメントが毒性試験における指標となり得ることが示された。

30

【0079】

1) エタノール (%)	細胞数 (1)	(2)	
(対照) 0	40	56	
5	0	0	
10	0	0	
30	0	0	
50	0	0	
2) ホルマリン (%)	細胞数 (1)	(2)	10
(対照) 0	40	56	
0.01	0	0	
0.5	0	0	
1	0	0	
10	0	0	
3) アジ化ナトリウム (%)	細胞数 (1)	(2)	20
(対照) 0	40	56	
0.01	0	46	
0.1	0	0	
0.25	0	0	
0.5	0	0	
1	0	0	

【0080】

【発明の効果】

本発明による毒性試験方法はバイオアッセイ系であるため、未知の毒性物質や複合的に影響するもの等も検出可能であり、また、細胞走化性という極めて鋭敏な生体反応を利用し、或いは細胞のランダムムーブメントを指標とすることができますため、微量の毒性物質でも高感度、且つ短時間で検出・測定することが可能である。

【0081】

本発明は、環境中に存在する物質の毒性試験の他に、新規な薬剤の開発過程において薬剤候補物質の毒性試験等に利用することができ、その他、食品、飲料を始めとする生活関連物質の生体への影響を調査するためにも応用することができる。特に、新薬開発においては、新規物質の安全性を動物実験により間接的に確認しているが、本発明によれば、その物質が与える影響を、ヒト細胞を用いて直接的に検証することができます。

【0082】

即ち、本発明によれば、様々な疾病と密接な関わりを有する免疫システム等に対して影響を及ぼす物質の評価が可能である。即ち、好酸球等の細胞の走化性はアレルギー等の免疫反応と密接な関係があると考えられていることから、これ等の細胞の走化性に着目した毒性物質の検出は、アレルギー等を含む免疫反応の異常を引起す毒性物質の検出を迅速に行うこと可能にすると期待される。

【0083】

本発明において使用する装置は、細胞を個々のレベルで直接観察することができ、その容積が小さくても、細胞使用量が少ない。これは、多数の検体について試験を行うとき、細胞の入手の問題が少なく、メリットが高い。例えば、末梢血からごく少量しか得ること

30

40

50

が出来ないために研究が進んでこなかつた好酸球、好塩基球、单球等についてもアッセイを容易に行うことができる。

【0084】

本発明において使用する装置によれば、走化性を指標とする場合においては、細胞のランダムムーブメントの影響を少なくすることができるため、測定のバックグラウンドが低く、正確な判定が可能である。また、ランダムムーブメントを指標とすることもでき、その場合は、高価な走化性因子を使用しないで済むというメリットがある。

【0085】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の毒性試験で用いられる細胞走化性検出のための装置の一例を示す概念図

10

【図2】図1の装置のウエルユニットの下面図。

【図3】本発明の毒性試験で用いられる細胞走化性検出装置の他の例を示す。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図4】本発明の毒性試験で用いられる細胞走化性検出装置の他の例であって、ウエルに試料を注入・採取するための管3と試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管4が設けられている装置の構造を示す概念図。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図5】試料注入管の上部にピペット先端部の導入口を設けた装置の例を示す。(1)は断面図であり、(2)は上面図である。

20

【図6】本発明の毒性試験で用いられる細胞走化性検出装置の他の例であって、細胞を入れるウエル2Aの管3Aの上端部3Abが、他のウエル2Bの管3Bの上端部3Bbより高く設定されている構造を示す概念図。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図7】本発明の毒性試験で用いられる細胞走化性検出装置の他の例であって、ウエルに試料を注入・採取するための管3と試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管4が設けられている装置において、細胞を入れるウエル2Aの管3A、4Aの上端部3Ab、4Abが他のウエル2Bの管3B、4Bの上端部3Bb、4Bbより高く設定されている構造を示す概念図。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

30

【図8】図7の構造の変形例を示す。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図9】ウエルが流路を介して3連式に連通する場合の基板の上面図を示す。

【図10】複数のウエル2B₁～₄が流路1を介して1つのウエル2Aに連通している場合の基板の上面図を示す。

【図11】図10の基板を備えた装置であって、図10の一点破線における断面図を示す。矢印I及び矢印IIは、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

【図12】流路に沿って壁が設けられたウエルの例を示す図である。

【図13】流路に沿って壁が設けられたウエルの他の例を示す図である。

【図14】図10の連通様式が円形に構成された場合の上面図を示す。

40

【図15】流路1の構造の一例を示す。

【図16】流路1における土手8が多段式のテラス11-₁～₄を有する場合を示す。

【図17】流路1における障壁12と溝13の配列例を示す。矢印は、相対するウエルに向かう方向を示す。

【図18】図17の流路1の断面図を示す。

【図19】流路1を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝13が、これに直交する2本の溝14で連通している場合を示す。矢印は、相対するウエルに向かう方向を示す。

【図20】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を横切るごとに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。図は、障

50

壁自体の幅が変化する場合を示す。

【図21】図20の変形例で、障壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図22】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する3本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るごとに相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図23】障壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっている場合を示す。

図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図24】土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで障壁の列を2箇所に形成した例を示す。(1)は上面図、(2)は断面図である。 10

【図25】図24に示す流路において画面の位置決めのための印15を2箇所に設けた例を示す。(1)は上面図、(2)は断面図を示す。

【図26】流路において画面の位置決めのための印15を1箇所に設けた例を示す。

【図27】土手に、細胞の移動を制限するための障害物16を設けた場合の例を示す。

【図28】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

【図29】図12のウエルが集積配置された例を示す図である。

【図30】複数種のユニットを多数集積させた例を示す説明図である。

【図31】多数のユニットを円形に集積させた例を示す。

【図32】図31の一点破線における断面図である。

【図33】細胞走化性検出装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。 20

【図34】細胞のランダムムーブメントによる溝の通過を制限するための流路の構造の例を示す。矢印は細胞が走化性により進行する方向を示す。

【図35】細胞をウエルに注入した直後に毒性物質を作用させる方法で試験を行った場合の結果を示す。(1)はエタノール、(2)はアシ化ナトリウム、(3)はホルマリンを作用させた場合の結果を示す。

【符号の説明】

1 : 流路

2 : ウエル。添字のA、B、B₁ ~ n、Cはウエルの区別を意味する。

30

3 : 試料注入・採取用管。添字のA、B、B₁ ~ n、Cはウエルの区別を、aは管3に対応する基板5の貫通孔を、bは管3の上端部を夫々意味する。

4 : 試料の注入・採取時ににおける昇圧・減圧を回避するための管。添字のA、B、B₁ ~ n、Cはウエルの区別を、aは管4に対応する基板5の貫通孔を、bは管4の上端部を夫々意味する。

5 : 基板

5' : バッキング

30

6 : ガラス基板

7 : 管を穿ったプロック

8 : 土手

40

9 : 検出器

10 : 管の上端部により共有される空間

11、11-1 ~ 4 : テラス

12 : 流路1における障壁

13 : 流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝

14 : 溝13に直交する溝

15 : 画像の位置決めのための印

16 : 障害物

17 : カバーキャップ

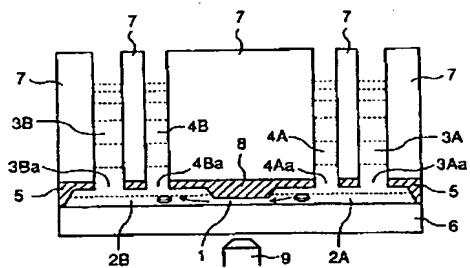
18 : O-リング

50

19: ガイドピン受孔
 20: ガイドピン
 21: 中間支持体
 22: 底支持体
 23: 底部基板
 24: 流路に沿って設けられた壁
 25: 折り返し障害物
 ↓: 装置を満たす液体の液面の位置
 ↓I: 上位にある管の上端部が覆われる液面の位置
 ↓II: 上位にある管の上端部が露出する液面の位置

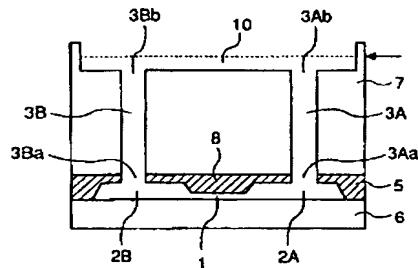
10

【図1】



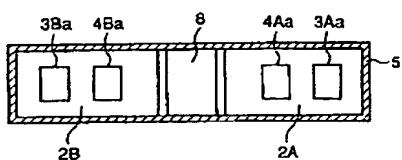
1: 流路
 2: ウェル
 3: 試料注入・採取用管
 4: 試料の注入・採取における昇圧・減圧を回避するための管
 5: 基板
 6: ガラス基板
 7: 管を穿ったブロック
 8: 手
 9: 排出端

【図3】

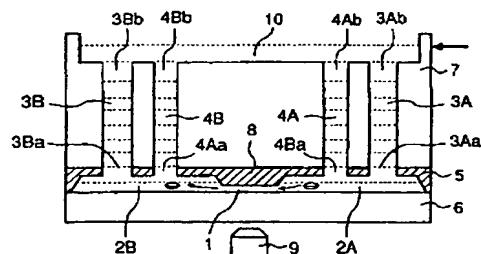


10: 管の上端部により共有される空間
 ←: 装置を満たす液体の液面の位置

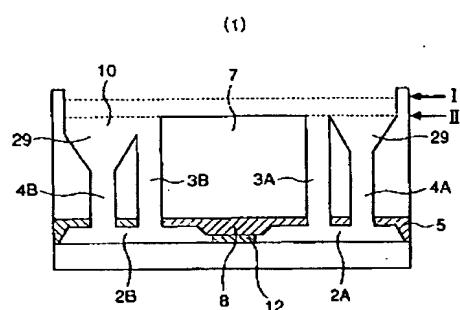
【図2】



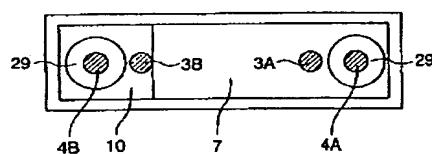
【図4】



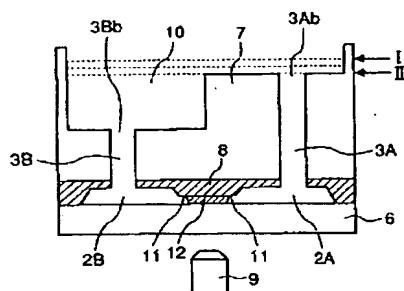
【図 5】



(2)

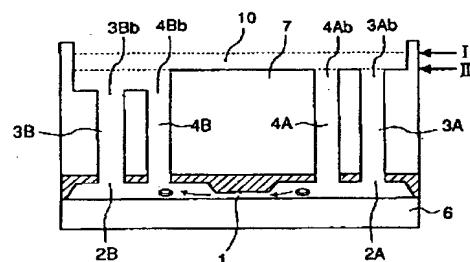


【図 6】

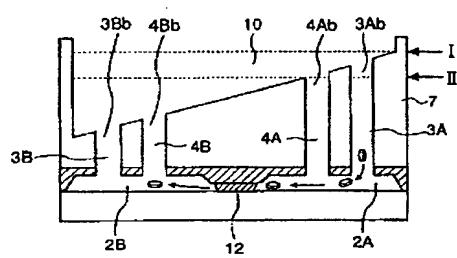


11: テラス
 12: 流路 1 における障壁
 ←I: 上位にある管の上端部が覆われる液面の位置
 ←II: 上位にある管の上端部が露出する液面の位置

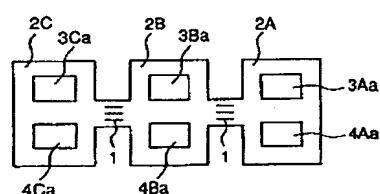
【図 7】



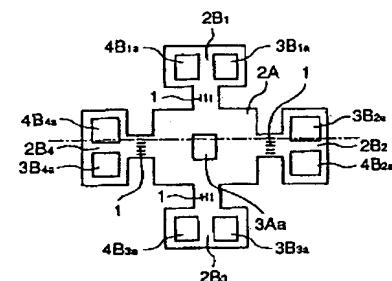
【図 8】



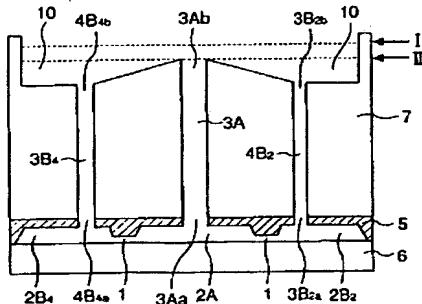
【図 9】



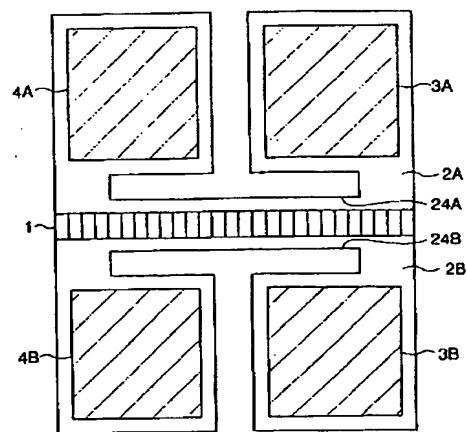
【図 10】



【図 11】

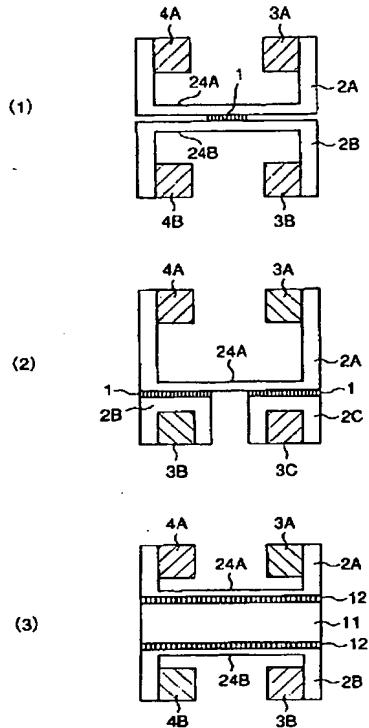


【図 1 2】

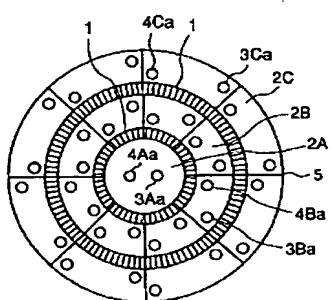


24: 流路に沿って設けられた壁

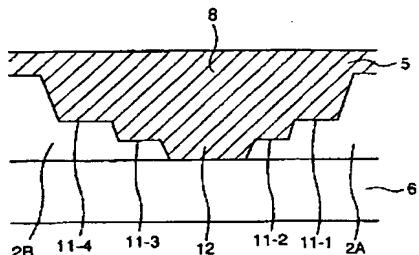
【図 1 3】



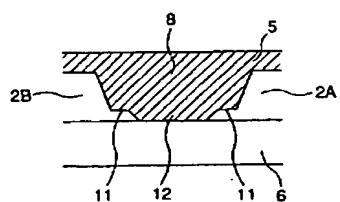
【図 1 4】



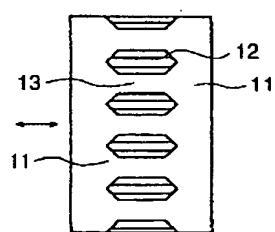
【図 1 6】



【図 1 5】

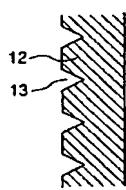


【図 1 7】

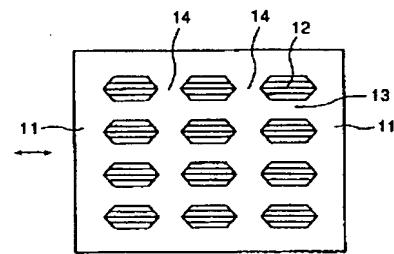


13: 流路を挟んで相対するウェルに向かう方向の溝

【図 18】

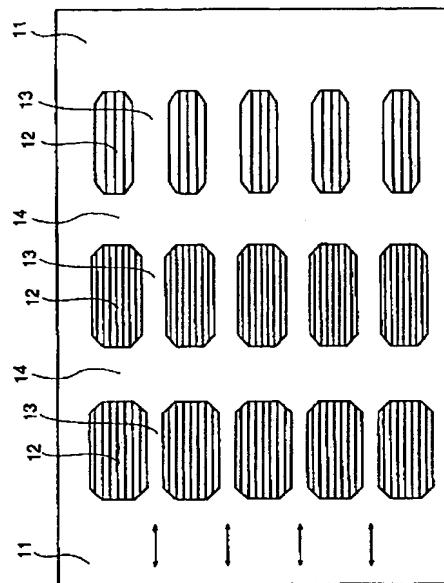


【図 19】

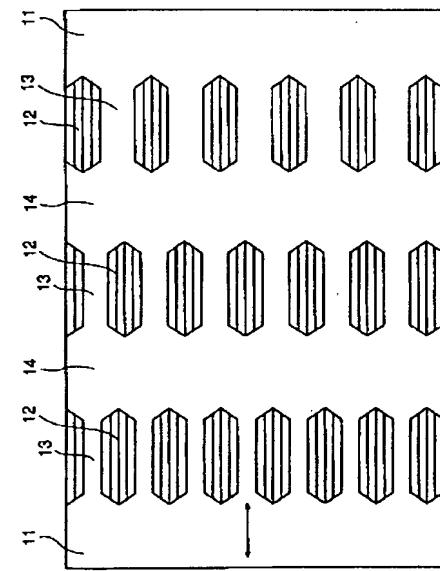


14: 漢 13 に面する面

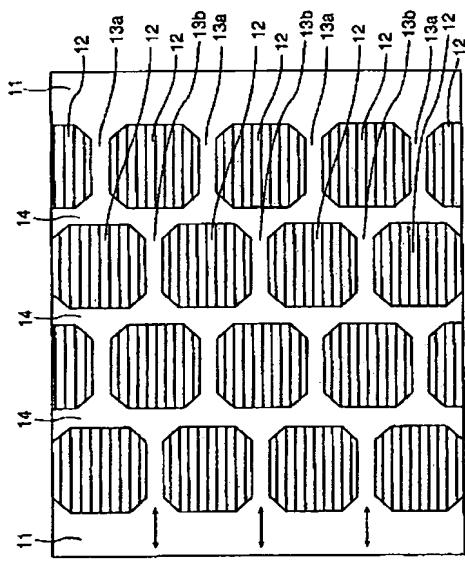
【図 20】



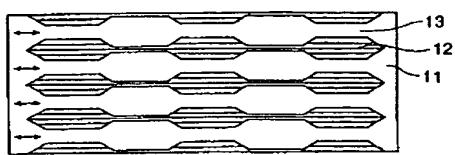
【図 21】



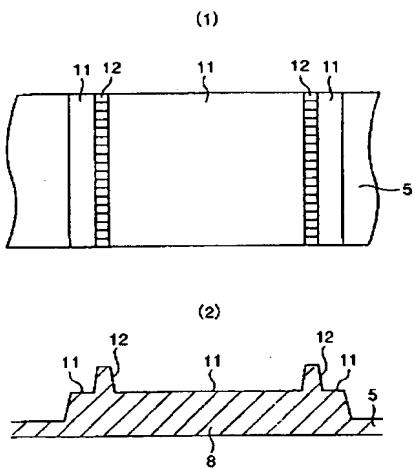
【図 22】



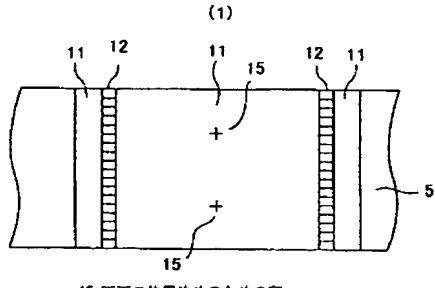
【図 2 3】



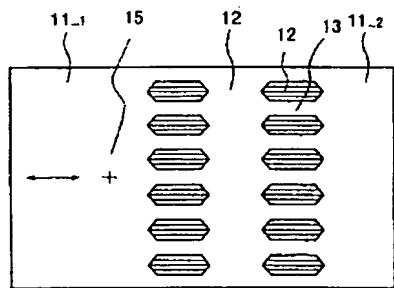
【図 2 4】



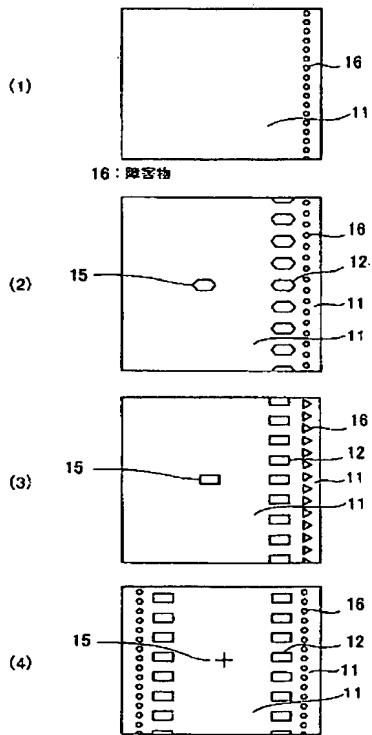
【図 2 5】



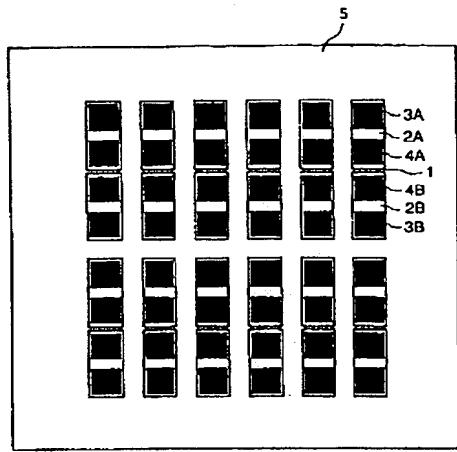
【図 2 6】



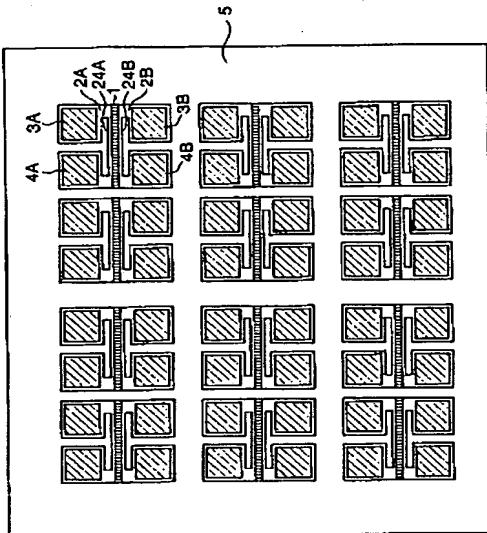
【図 2 7】



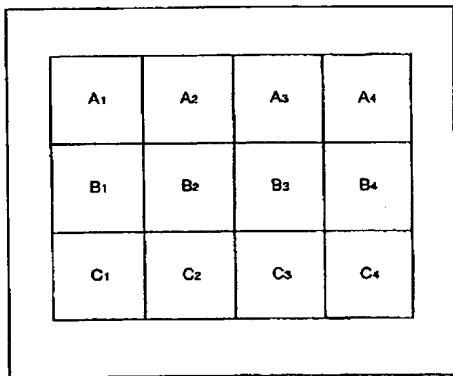
【図28】



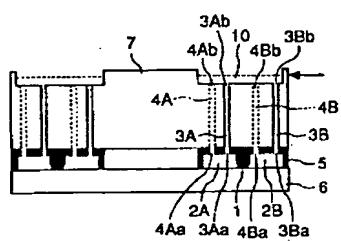
【図29】



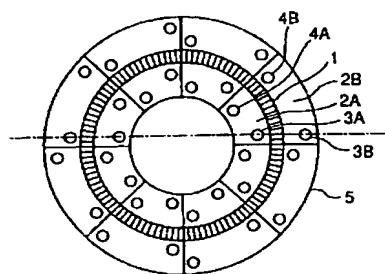
【図30】



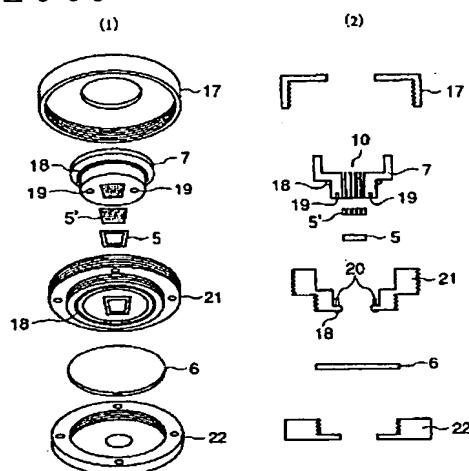
【図32】



【図31】

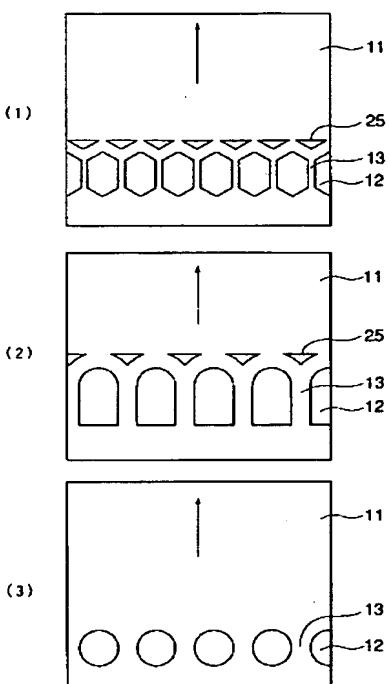


【図3-3】



5: パッキング
 17: カバーキャップ
 18: O-リング
 19: ガイドピン受孔
 20: ガイドピン
 21: 中間支持体
 22: 底支持体

【図3-4】



25: 折り返し隠密物

【図3-5】

